

300627

6
20



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
(INCORPORADA A LA U. N. A. M.)

**“ DETERMINACION DE LA
BIOEQUIVALENCIA DE UN
MEDICAMENTO A BASE DE VITAMINA A,
PARA USO HUMANO ”**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LAURA ELENA GONZALEZ LOREDO

ASESOR DE TESIS

Q. F. B. María Leticia Linares Estudillo

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADEZCO

**Primeramente a Dios, quién me
ha llevado de la mano durante
toda mi vida.**

**A mis Padres, a quienes debo todo
lo que tengo y lo que soy.**

**A mis hermanos, mis amigos
incondicionales.**

**A la memoria de mis abuelos,
quienes me acompañan siempre.**

A mis tías y primas por su cariño.

**A Alejandro, quien me ha ayudado a
superar la adversidad, y por
el amor que me une a él.**

**Al Ing. Jara, quién ha sido un guía
importante en mi vida profesional.**

**A Laura, Livia y Elvira, por su
apoyo incondicional.**

**A Lety Linares, quién me dió alientos
para llegar a este momento.**

El desarrollo del presente trabajo de investigación, fué posible gracias al apoyo recibido por el: " Laboratorio Lambda Científica ", en donde se llevó a cabo su desarrollo, bajo la asesoría y supervisión de el Ing. J. Héctor Jara Farjeat y el Dr. Omar Hernandez.

I N D I C E

| | PAG. |
|--|-------------|
| I.. OBJETIVO | 1 |
| II. INTRODUCCION | 2 |
| III. GENERALIDADES | 4 |
| III.1 Estructura Química y forma activa | 4 |
| III.2 Fuentes de vitamina A | 6 |
| III.3 Función Biológica | 7 |
| III.4 Metabolismo | 8 |
| III.5 Vitamina A, deficiencia y toxicidad | 13 |
| III.5.1 Deficiencia | 14 |
| III.5.2 Manifestaciones oculares | 14 |
| III.5.3 Manifestaciones somáticas de la deficiencia de vitamina A | 15 |
| III.5.4 Toxicidad | 17 |
| III.6 Separación y cuantificación de Vitamina A | 17 |
| III.6.1 Método espectrofotométrico | 19 |
| III.6.2 Método fluorométrico | 19 |
| III.6.3 Método colorimétrico | 20 |
| III.6.4 Cromatografía de líquidos de alta presión | 22 |

| | |
|---|-----------|
| IV. DISEÑO EXPERIMENTAL | 24 |
| IV.1 Aparatos y materiales | 24 |
| IV.2 Material Biológico y reactivos | 26 |
| IV.3 Diseño del experimento | 27 |
| IV.4 Valoración del palmitato de retinol | 33 |
| IV.5 Metodología | 33 |
| IV.6 Comprobación del método analítico | 37 |
| V. ANALISIS DE RESULTADOS DEL PRIMER EXPERIMENTO. | 39 |
| V.1 Discusión de resultados | 42 |
| V.2 Observaciones | 44 |
| V.3 Propuesta | 49 |
| VI. ANALISIS DE RESULTADOS DEL SEGUNDO EXPERIMENTO | 52 |
| VI. 1 Discusión de resultados | 55 |
| VII. CONCLUSIONES | 57 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA | 59 |

I. OBJETIVO

Verificar que una fórmula hidromiscible que contiene palmitato de retinol puede ser absorbida por ratas de laboratorio.

1.1 Comprobar que la Vitamina A en dicha fórmula hidromiscible es transportada por medio de la sangre y almacenada principalmente en el hígado.

1.2 Comprobar que la fórmula hidromiscible de Vitamina A del estudio, tiene un comportamiento equivalente al de una fórmula de Vitamina A de referencia, administrándola como complemento dietético por vía de administración oral en ratas de laboratorio.

1.3 Comprobar que la capacidad de absorción por vía oral de vitamina A en los animales entre una fórmula y otra, no presenta una diferencia mayor al 5%.

II. INTRODUCCION

Dentro de las Vitaminas liposolubles, la Vitamina A juega un papel muy importante en la nutrición humana, ya que aunque actúa en pequeñas cantidades, su deficiencia produce retardos en el crecimiento y modificaciones en diferentes tejidos, especialmente en la membrana epitelial y mucosa, reduciendo al mismo tiempo la resistencia a las enfermedades, alteraciones visuales y en la utilización de proteínas en la dieta (46). Se ha demostrado además que guarda una íntima relación con el metabolismo del hierro, causa por la cual su deficiencia puede llegar a producir anemia (29). De la misma forma y debido a que puede permanecer almacenada un año, un exceso de Vitamina A puede llegar a producir efectos de toxicidad, como lo son una pérdida en la integridad de la membrana, trayendo como consecuencia, descamación de la piel y membranas mucosas e hipercalcemia (20).

Debido a esto y a los problemas nutricionales que existen en los países en vías de desarrollo que no tienen una dieta balanceada, ya sea por ignorancia o bien por falta de recursos, se han buscado posibles soluciones al problema. En Latino América el INCAP (Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá) fue pionero en el desarrollo de procesos para la fortificación de azúcar con Vitamina A. En 1982 en Guatemala se llevó a cabo un programa de fortificación de azúcar con Vitamina A, a nivel Nacional, periodo durante el cual Mejía y Arroyave estudiaron los efectos producidos por los cambios en la nutrición, los indicadores bioquímicos en nutrición de hierro y metabolismo en la misma población. De acuerdo con esto los laboratorios farmacéuticos han desarrollado fórmulas que permiten la fortificación de azúcar (29).

Una de estas fórmulas es el objeto de nuestro estudio, ya que para poder ser distribuida, se necesita probar que la fórmula puede ser absorbida y aprovechada en el organismo. Esto fue probado haciendo un ensayo Biológico de la fórmula en ratas de laboratorio.

En este estudio fue interesante observar, independientemente, todos los problemas que ocasiona en el organismo la deficiencia de un elemento tan importante como lo es la Vitamina A.

III. GENERALIDADES

La ceguera nocturna es una enfermedad reconocida desde los antiguos pobladores de Grecia y Egipto. Para su cura se utilizaba el jugo de hígados cocidos aplicados en los ojos de los pacientes o ingerido por los mismos (49). El principio activo en el hígado es la Vitamina A, que fue identificada como factor de crecimiento en 1915 y caracterizada químicamente en 1930 (30).

A principios de este siglo en el aceite de hígado de bacalao se descubrió la existencia de un importante factor nutricional que prevenía el raquitismo y una enfermedad ocular llamada xeroftalmia, llamándole "Vitamina A liposoluble". En 1922 Mc Collum informó que dicho aceite contenía 2 vitaminas diferentes, una de ellas efectiva contra el raquitismo y la otra capaz de prevenir y curar la enfermedad ocular, conservándose para esta el nombre de Vitamina A (6).

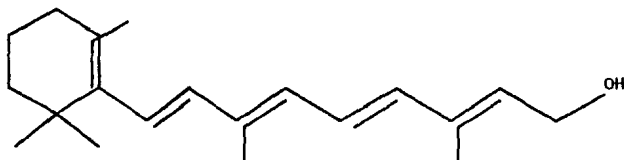
La Vitamina A en dosis prolongadas es particularmente efectiva en tratamientos de enfermedades de la piel, como escamosidad o queratinización (45). En la década pasada fue utilizada en el tratamiento del cáncer de riñón, pero debido a que se necesitaban grandes dosis para su efectividad, su relativa toxicidad hizo que su uso disminuyera. La mayor acción de los retinoides es en la prevención de la neoplasia, y algunos son activos contra tumores. Los carotenoides en pequeñas cantidades, se han utilizado en la prevención del cáncer, pero todavía se sigue investigando (5 y 42).

III. I Estructura Química y forma activa

El término Vitamina A se usa genéricamente para todos los derivados de las beta-iononas, los carotenoides de provitamina A, los carotenos alfa, beta y gamma y el

trans-retinol (34). Son todos compuestos isoprenoides con un anillo carboxílico de seis miembros y una cadena lateral de once átomos (22).

Retinol



De los cuatrocientos carotenoides conocidos, sólo treinta tienen actividad biológica. En adición a los que se encuentran en la naturaleza, un gran número de análogos pueden ser sintetizados.

El retinol es la forma más común en los tejidos de los mamíferos, peces marinos y el retinol 2(3,4 dehidroretinol), común en los peces de agua dulce.

Los carotenos alfa, beta y gamma, no tienen actividad por sí mismos, pero se convierten en Vitamina A en la mucosa intestinal e hígado por reacciones enzimáticas (22). Las tres formas biológicas activas son el retinol, retinal y ácido retinoico (20).

Los ésteres de Vitamina A son más estables que la Vitamina A por sí sola. La estabilidad de Vitamina A, es afectada por el calor, luz y aire y el factor más importante es la oxidación, que es catalizada por trazas de metales como el hierro y el cobre. La oxidación puede ser inhibida con la adición de antioxidantes. Así mismo, la Vitamina A es estable cuando se calienta en atmósfera inerte y temperatura

moderada en la obscuridad. Con la luz ultravioleta (325 - 328), es destruida o biológicamente inactivada.

La Vitamina A disuelta en aceite con bajo contenido de peróxido es estable por tres meses cuando se guarda en frascos bien cerrados, y los ésteres de Vitamina A en las mismas condiciones, son más estables.

En preparaciones de multivitaminas, la caseína hidrolizada sola o en combinación con clorhidrato de cisteína protege bien a la vitamina A. Aminoácidos como la aspargina, glicina, cisteína, metionina, ácido glutámico y triptofano, no dan una buena estabilidad a la vitamina A, para almacenamiento.

La estabilidad de la vitamina A depende de la naturaleza y pH del medio suspensor y de las concentraciones de Vitamina B1 en el caso de fórmulas líquidas orales. Se consideran condiciones óptimas de almacenamiento para la Vitamina A, un pH en el medio de 6 y un sistema compuesto de sorbitol - propilenglicol - glicerol etilalcohol (2:1:1:1), jarabe de azúcar - glicerol - agua (2:2:1) y jarabe de azúcar - glicerol (1:1), los cuales conservan un 70% de vitamina A durante 5 meses (18).

III.2 Fuentes de Vitamina A

1.- Fuentes Naturales.-Se encuentran en los tejidos de los mamíferos siendo el hígado una excelente fuente de Vitamina A, peces marinos, en algunos peces de agua dulce (22), en los frutos amarillos y vegetales pigmentados como zanahorias y espinacas (2). También se encuentran en los alimentos tales como productos lácteos: leche, crema, mantequilla y en la yema de huevo (2 y 6).

2.- Fuentes Farmacéuticas.- En forma farmacéutica la Vitamina A puede administrarse en soluciones o ampollitas bebibles, en emulsiones de aceite de hígado

de bacalao combinada con vitamina D; y en combinación con Vitamina C en gotas y soluciones. En pomadas a base de cloruro de Zinc en ampollitas combinadas con eucalipto, mentol, guayacol, y aceite de hígado de bacalao (10), y en cápsulas para administración en forma oral.

III.3 Función Biológica

La vitamina tiene relación con las funciones del ojo, el crecimiento, la reproducción, la diferenciación celular, la secreción mucosa y las respuestas inmunes. Excepto en el caso de la visión, no se conocen los mecanismos celulares responsables. La Vitamina A mantiene las células epiteliales en un estado de humedad y ablandamiento. En los casos de deficiencia, estas células epiteliales (capas externas de la piel, revestimiento de los aparatos gastrointestinal, respiratorio y urogenital) se secan y queratinizan, pudiendo estar relacionado este proceso con la protección contra organismos infecciosos. La Vitamina A es necesaria para la conversión ósea de osteoblastos en osteoclastos y para la diferenciación y función normales de los ameloblastos (células del esmalte dental) (20).

a) *Función somática.- Desarrollo y diferenciación de la estructura epitelial y huesos. Las formas de Vitamina A involucradas son: retinol, retiniléster y ácido retinoico.*

b) *Reproducción.- Esencial para espermatogénesis, oogénesis, desarrollo de la placenta y crecimiento fetal y embrionario.*

c) *Proceso visual.- La Vitamina A se requiere para la visión en la oscuridad y posiblemente para la percepción del color. La forma activa de la vitamina A en la visión es el retinaldehído (45).*

III.4 Metabolismo

Después de la ingestión de alimentos con Vitamina A y carotenoides, éstos son liberados por la acción de la pepsina en el estómago y varias enzimas proteolíticas en la parte superior del tracto intestinal. Los carotenoides y los derivados de Vitamina A generalmente se agregan dentro de los glóbulos de grasa que son después dispersados en la parte superior del intestino por conjugación de los ácidos biliares. Los ésteres de xantófilas y Vitamina A que se encuentran en las emulsiones lipídicas son hidrolizados por varias esterasas en los jugos pancreáticos, formándose carotenoides y vitamina A libres.. Los triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol son hidrolizados en conjunto . Las partículas emulsificadas resultantes son difundidas dentro de la capa de las glicoproteínas alrededor de las microvillus de las células epiteliales del intestino y después son absorbidas. Las enzimas de la mucosa del intestino delgado convierten el beta - caroteno y el retinal en retinol. Una vez en las mucosas el retinol es reesterificado (palmitato) y transportado a los quilomicrones linfáticos hacia la circulación sistémica. Los quilomicrones liberan sus ésteres en el tejido adiposo y éstos son transportados hacia el hígado para su almacenamiento en asociación con las gotitas lipídicas de los hepatocitos. El ácido retinoico (más polar) es directamente absorbida en circulación portal, sin embargo no se almacena en hígado, sino que se excreta en la bilis como un conjugado glucurónico (20 y 24).

TRANSFORMACIÓN DE VITAMINA A Y CAROTENOS EN LAS CELULAS MUCOSAS.-

Una variedad de factores influye en la eficiencia de la absorción de carotenoides y vitamina A, tales como la presencia de grasa, proteína y antioxidantes en los alimentos, la presencia de bilis y una composición normal de enzimas

pancreáticas en el lumen intestinal y la integridad de las células mucosas. De cualquier manera el retinol es absorbido de las soluciones micelares por detergentes iónicos o no iónicos, la absorción de carotenoides parece tener un requerimiento específico de sales biliares y tiende a ser muy lenta. La eficiencia de la absorción de la ingestión normal de vitamina A es 80 - 90 % , con una ligera disminución en la eficiencia con dosis elevadas. La eficiencia de la absorción de pequeñas cantidades de beta- caroteno es del 40 - 60 % y decrece con el incremento de la dosis (14).

La mayoría del retinol absorbido es esterificado con el ácido palmítico en las células (38). La coenzima A y ATP son requeridas para dicha esterificación sin embargo también se puede llevar a cabo la trans-esterificación con fosfolípidos y algunos otros acil-donadores (12). Parte del retinol puede ser oxidado a retinaldehído y otros carotenoides de provitamina A se unen en una larga cadena por medio de dobles enlaces (15-15) produciendo dos moléculas de retinaldehído (13 y 15). La enzima que cataliza esta reacción es la 15 - 15 -caroteno - dihidrogenasa, enzima soluble, cuya actividad disminuye con una proteína inadecuada. Algunos carotenoides monohidroxilados pueden producir una molécula de retinaldehído por una excéntrica unión de la cadena de carotenoides, seguida de un corte de la cadena. Mucho del retinaldehído formado es reducido por la retinaldehidoreductasa a retinol, que después es esterificado. El retiniléster junto con triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol, son después incorporado dentro de un quilomicrón (39).

La quilomícra que contiene retiniléster y pequeñas cantidades de retinol es transportada a través de la linfa dentro de la circulación general. Muchos triglicéridos dentro de la quilomícra son degradados con relativa rapidez por la protein-lipasa resultando un pequeño pero denso quilomicrón remanente. El residuo es removido por la circulación hacia el hígado (9). Sin embargo, pequeñas cantidades

de Vitamina A son encontradas en muchos tejidos; más del 90% de la vitamina A es almacenada en el hígado (35). La forma almacenada de vitamina A es probablemente un complejo lipoproteínico, en dicho complejo, la vitamina A se encuentra en un 96% como retiniléster y un 4% como retinol no esterificado (19). Un fuerte enlace de retinil-éster-hidrolasa está asociada con el complejo que, en presencia de un aceptor de proteína, hidroliza al retinil éster y transfiere el retinol al aceptor. Un proceso similar ocurre en los hepatocitos. La hidrólisis del éster es catalizada por la retinil-palmitato-hidrolasa, que transfiere al trans-retinol una proteína fijadora de retinol (RBP) (36). el resultante holo-RBP es procesado dentro del aparato de Golgi y con la ayuda de los microtúbulos es secretado dentro del plasma (40).

El RBP humano es una cadena polipeptídica que posee un sitio de enlace para todo el trans-retinol. En el plasma, el RBP forma un complejo 1:1 molar reversible con prealbúmina, un tetrámero, que también es acarreador de las hormonas tiroideas (28). La vuelta de la holo-RBP en el plasma es rápida. La vida media de la RBP asociada con la prealbúmina en cambios es de once a dieciséis horas, en forma libre es de cuatro horas. Con deficiencia de vitamina A en el plasma, el RBP disminuye 50% y aparece en la forma apo y consecuentemente aumenta su concentración (37).

La concentración de RBP aumenta en enfermedades crónicas del riñón y son moderadamente elevados en mujeres que toman estrógenos análogos a los fármacos anticonceptivos. Una severa malnutrición proteica baja los niveles de RBP en aproximadamente un 50% (31).

En condiciones normales, la concentración de RBP en plasma es cuidadosamente controlada. La administración de ácido retinoico como quiera que sea, baja marcadamente las concentraciones de RBP en plasma. Se cree que algunos

mensajeros (incluyendo ácido retinoico) de los tejidos periféricos, provee de señales positivas o negativas al hígado para la liberación adicional de holo-RBP (21).

De varios procesos que involucran vitamina A, la combinación de trans-retinol con RBP en el hígado es la más específica. Sin embargo, otros análogos de Vitamina A se pueden acomplejar con RBP en condiciones de laboratorio. La administración de ácido retinoico está principalmente enlazada a la seroalbúmina en el suero, la cual tiene una alta afinidad con ácidos grasos (47).

Después de que la holo-RBP se une a la superficie de la célula, todo el trans-retinol es transferido al interior de la célula y la apo-RBP resultante es liberada. La forma apo, la cual enlaza con menos fuerza que con holo-RBP, puede cambiar su conformación y unirse proteolíticamente antes de su liberación. La apo-RBP que no se une a la prealbúmina es llevada por células del riñón y degradada. Debido a que la vitamina A es comúnmente usada en el tratamiento de varias enfermedades de la piel, las células epiteliales anormales formadas en condiciones patológicas, pueden tener receptores para holo-RBP (7).

METABOLISMO Y EXCRECIÓN.- *El beta-caroteno y otros carotenoides de provitamina A son convertidos a retinal en las células mucosas del intestino y reacciones similares ocurren en el hígado y en otros órganos. Retinal y retinol son probablemente convertidos reversiblemente en presencia de NAD o NADP. La esterificación y des-esterificación de la vitamina A ocurre extensivamente en intestino, hígado y otros tejidos y es catalizada por dos diferentes grupos de enzimas, las metiltransferasas y las hidrolasas. (24)*

Biológicamente, el retinaldehído es convertido en presencia de nicotinamida-adenin-dinucleótido o adenin-dinucleótido a ácido retinoico, que puede ser oxidado por medio de NADPH a ac. 4-hidroxitretinoico (17).

El ácido retinoico y sus metabolitos pueden ser reducidos en sus cadenas oxidativamente con una pérdida secuencial de bióxido de carbono o fragmentos de 2 y 3 carbonos. Finalmente, una epoxidasa puede convertir ácido retinoico a ácido 5,6-epoxitretinoico (23).

En general los productos obtenidos que tienen poca o nula actividad biológica, son excretados en orina, sin embargo, los productos de oxidación que contienen cadenas intactas, son excretados en la bilis. En último caso, la mayoría son productos altamente polares incluyendo beta-glucurónidos de retinol y ácido retinoico (47).

Una porción significativa del retinol beta-glucurónido biliar y probablemente de otros derivados más polares, es reabsorbido en el intestino y regresado al hígado.

La circulación enterohepática de los derivados de Vitamina A ocurre de forma similar, una fracción significativa del retinol que es acarreado a los tejidos por medio de RBP es esterificado y transportado otra vez al hígado. La eficiencia de estos dos mecanismos de reciclaje puede estar influenciado por los requerimientos nutricionales de vitamina A en condiciones específicas (40).

Cuando se requiere Vitamina A, el palmitato de retinol almacenado es hidrolizado y el retinol libre, se combina con una proteína fijadora de retinol. El complejo PFR-retinol es segregado a la circulación donde se une a la prealbúmina. este complejo es transportado a la circulación hacia tejidos efectores que poseen

receptores específicos para la PFR y el retinol es transferido intracelularmente hacia otra proteína fijadora de retinol de citosol (PFRC). El complejo PFRC-retinol probablemente transporta el retinol hasta su sitio de acción funcional en el interior de la célula (23).

La Vitamina A es excretada por la orina y las heces fecales principalmente en forma de ácido retinoico y otras formas no identificadas (1,32).

III.5 Vitamina A, deficiencia y toxicidad.

La deficiencia de vitamina A generalmente es endémica y ocasionalmente aparece en sociedades desarrolladas en pacientes que padecen de mala absorción, desórdenes de transporte o enfermedades del hígado. La toxicidad generalmente ocurre con el abuso de suplementación o terapia con vitaminas.

Como se ha demostrado en la literatura, en el metabolismo de Vitamina A y homeostasis del retinol en suero, la concentración de retinol en suero es regulada exactamente si los almacenes del hígado están en concentraciones fisiológicas adecuadas (20-300 microgramos/g de hígado), sin embargo los niveles de suero son indicativos del estado de almacenamiento de vitamina A, sólo si existe disminución o exceso de Vitamina A. Con una deficiencia marginal ocurre un daño en el tejido periférico antes de que los cambios en los niveles de retinol en suero ocurran. Al principio de la hipervitaminosis A los cambios en los niveles de vitamina A en suero también ocurren tarde. Es por esto que la determinación de vitamina A en suero no da ninguna información sobre las reservas de vitamina A en hígado (16).

III.5.1. Deficiencia

La deficiencia se ha estudiado extensamente en animales y humanos, los signos primarios incluyen pérdida de apetito, crecimiento deficiente, baja resistencia a infecciones y respuesta inmunológica deficiente (50). Estos síntomas son identificados cuando la concentración de vitamina A en plasma decae de 20 a 50 microgramos/dl. Con la deficiencia ocurre keratinización de los tejidos epiteliales en los ojos, glándulas exócrinas, tracto gastrointestinal y genitourinario con la reducción de secreción de células de la mucosa. Los cambios más tardíos en animales incluyen alteraciones en el sistema nervioso, cambios hematopoyéticos, esterilidad, malformaciones congénitas y finalmente la muerte con infecciones secundarias. En humanos los signos clínicos más importantes son las manifestaciones oculares (13)

III.5.2 Manifestaciones oculares

La xeroftalmia es el caso más común de ceguera en niños en todo el mundo. Una estimación reciente, sugiere que aproximadamente 250,000 niños contraen anualmente esta enfermedad. Muchos otros sufren por una malnutrición proteín-energética (PEM) como marasmo o kwashiorkor, la mortalidad de 10 - 20% está relacionada con pacientes que sufren de xeroftalmia.

La xeroftalmia ha sido reconocida como endémica en muchas ciudades del sur y este de Asia y parte de Latinoamérica y recientemente en ciudades de África y Medio Oriente. En estas zonas la xeroftalmia es causada por virus trayendo serios efectos en la nutrición de los niños (48).

En muchas ciudades desarrolladas los vegetales no son suficientes, en estas circunstancias los niños pequeños, y las mujeres embarazadas y lactantes son especialmente afectadas. Y no es que las frutas y vegetales no se puedan obtener, la

deficiencia ocurre porque aunque las altas zonas endémicas están situadas en zonas tropicales y subtropicales, el problema radica en que la madre tiene una alimentación a base de arroz, trigo, maíz y papas que contienen nada o casi nada de carotenos incluyendo esto en la dieta del bebé a edad temprana. La leche de vaca no es rica en vitamina A y el incremento en el requerimiento durante el crecimiento y durante infecciones, no puede ser cubierto sin una suplementación.

Sin embargo la xerofstalmia es primeramente ocasionada por una mala absorción en la síntesis de RBP. La dieta de grasas es necesaria para el metabolismo y absorción de carotenoides y vitamina A en el intestino (19 y 41).

III.5.3 Manifestaciones somáticas de la deficiencia de vitamina A

Crecimiento y desarrollo.- En animales experimentales, una deficiencia temprana decae en una completa interrupción del crecimiento. Estas condiciones resultan de una reducción en el consumo de alimento (anorexia), que en este estado no está asociada con una distorsión en el gusto y en el olfato, las cuales si ocurrirían con una deficiencia crónica. En niños lactantes o en crecimiento, la determinación del crecimiento está asociada con una deficiencia de vitamina A. Infecciones a la par con el crecimiento, ocurren comúnmente junto con otras deficiencias en niños con niveles bajos de vitamina A.

Piel.- La respuesta de la piel a la deficiencia de vitamina A es diferente en niños y en adultos. En adultos la lesión más común es la hiperqueratosis y va precedida y/o acompañada de acné. Estas lesiones prevalecen en áreas de la piel que contienen varias glándulas sebáceas. Estas lesiones no son comunes en niños.

Sensación.- La deficiencia de vitamina A puede causar cambios metaplásticos en el puerco de Guinea. Anormalidades en el gusto y el olfato, pueden contribuir al decremento en la ingestión de alimentos que ocurren con deficiencia de Vitamina A.

Hematopotesis.- La deficiencia de vitamina A se identifica como la causa de la anemia de Wolbach y Howe. Algunos estudios muestran que una rápida disminución de las reservas de vitamina A, produce una severa anorexia; disminuye la ingesta de agua, que recae en la reducción del volumen de plasma. La anemia por deficiencia de vitamina A es acompañada de hipoferrremia, que es un almacenamiento anormal de hierro en el hígado y en pequeños niveles en la circulación.

Resistencia a las infecciones.-La deficiencia incrementa la susceptibilidad a infecciones, especialmente respiratorias y digestivas. Los mecanismos inmunológicos no son efectivos, disminuyen la síntesis de anticuerpos y las células de la inmunidad. Se pierde la protección epitelial y la secreción mucosa favorece la penetración de microorganismos en el tracto respiratorio e intestinal. Una inanición general favorece el crecimiento de organismos patógenos.

Reproducción.- En animales la deficiencia de Vitamina A tiene un efecto adverso en la reproducción. El efecto más aparente es una deficiencia severa que evita la concepción, causando la absorción o reabsorción del feto (45 y 51).

En animales produce cambios en el plexo, la absorción del fluido cerebroespinal y una contracción intracraneal. En fetos de conejo se produce hidrocefálea.

III.5.4 Toxicidad

La sintomatología de la toxicidad varía considerablemente dependiendo de la edad, y de la duración del consumo excesivo de Vitamina A; los niños pequeños son especialmente susceptibles. La toxicidad se presenta con presión intracraneal, vómito, dolor de cabeza y estupor (26).

Los principales síntomas de la toxicidad incluyen anorexia, resequead, descamación de la piel, comezón, caída del cabello y crecimiento de una membrana que rodea al hueso, adelgazamiento de los huesos pequeños de la mano, pies y huesos largos, alargamiento del hígado o bazo y muchas veces papiledema, visión doble y tumor cerebral. La concentración de vitamina A en plasma aumenta a 200 microgramos/dl. (44).

La hipervitaminosis se presenta con 300 microgramos/dl de plasma. Un prolongado y excesivo consumo de zanahorias, naranjas y espinacas, está implicado con una alta concentración de vitamina A.

La hipercarotenosis es ocasionalmente reportada en diabetes mellitus, hipotiroidismo y anorexia nervosa (27).

III.6 Separación y cuantificación de vitamina A

Para las determinaciones de vitamina A, en cualquier método que se siga, se pueden presentar interferencias debidas a carotenoides, grasas, ceras, compuestos lipídicos, esteroides, otras vitaminas liposolubles, isómeros o productos de oxidación de la vitamina A y aditivos presentes en el material que se va a analizar. Si

las cantidades de lípidos o materiales de interferencia son relativamente bajas, como en el caso de suero sanguíneo, se pueden obtener resultados satisfactorios rompiendo el complejo proteína-vitamina por desnaturalización con alcohol, seguida de una extracción con un solvente que solubilice la Vitamina A. Incluso si la cantidad de lípidos no es tan grande, comparada con la cantidad de vitamina A, como en el caso del hígado, no se requiere de una digestión alcalina (1).

Para muchas muestras, la hidrólisis alcalina o saponificación es requerida para convertir los retinolesteres en retinol, de esta forma, la materia saponificable es descartada en la fracción acuosa. La digestión alcalina, al mismo tiempo rompe gelatina, pectina o matrices similares que estabilicen los productos de vitamina A, con la finalidad de liberar los esteres de retinol, por medio de la hidrólisis y la extracción. Si la forma de vitamina A presente es desconocida, o hay más de una forma presente se requiere de la hidrólisis alcalina. El dimetil sulfoxido, agua caliente, glicerina o soluciones de fosfatos, han sido usadas para tratar de liberar la vitamina A de las matrices estabilizadoras (1).

Si se encuentran pequeñas cantidades de carotenoides en el extracto obtenido de vitamina A, la corrección puede ser hecha por medio de un ensayo colorimétrico. Grandes cantidades de carotenoides pueden ser removidas por cromatografía en alúmina, magnesia o sílica gel. Materiales fluorescentes irrelevantes en el extracto, como el fitoflueno, pueden intervenir en los métodos fluorométricos. Esteroides, otras vitaminas y productos de descomposición interfieren en las determinaciones espectrofotométricas, y la cromatografía en columna no los remueve satisfactoriamente. Una ventaja de los ensayos de HPLC es que la vitamina A puede ser separada de sustancias con las que se encuentra íntimamente relacionada, seleccionando la columna y el sistema de solventes adecuados (1).

III.6.1 Método espectrofotométrico

Principio.- El trans-retinol en isopropanol presenta absorbanza máxima a 325 nm. La excitación a la longitud de onda es directamente proporcional a la concentración de la vitamina A. La cantidad total de vitamina A, puede ser determinada si se conocen, la concentración, el grado de excitación, el grosor de la celda y el factor (el valor de F recomendado internacionalmente es 1,830 y es válido únicamente para Retinol puro en isopropanol y puede ser aplicada a sus ésteres, sólo después de saponificación). La curva de absorción en el ultravioleta, en los ésteres de vitamina A en isopropanol se encuentran entre 326 y 328 nm. El factor utilizado para convertir el coeficiente de extinción en vitamina A en este caso es de 1,900 (43).

Desafortunadamente este método únicamente puede ser utilizado, cuando se tiene la certeza de que no hay otra sustancia presente que pueda absorber luz entre 300 y 350 nm; porque se obtendría un falso valor de vitamina A al obtener una "absorción irrelevante". Para superar esta absorción irrelevante Morton & Stubbs hicieron una corrección midiendo la absorbanza a 325, 310, y 334 nm.

III.6.2 Método fluorométrico

Principio.- Este método depende de la concentración de Retinol para medir la vitamina A contenida. Un extracto de la muestra es excitado por radiación a 330 nm y la emisión fluorescente es medida a 480 nm. El sulfato de quinina puede ser usado como estándar secundario para calibrar el fluorómetro en cada serie de determinaciones.

Las mediciones fluorométricas, con frecuencia son más específicas que las mediciones por absorbancia porque muchas sustancias que absorben en la región del ultravioleta, no presentan fluorescencia. De todas formas, en extractos de diferentes tipos de muestras (sangre), las sustancias fluorescentes se obtienen después de una hidrólisis alcalina, extracción con solventes orgánicos y cromatografía, o haciendo una corrección a la fórmula (1). Sin embargo se ha demostrado que el método puede ser aplicado, midiendo el Retinol directamente en el suero, sin necesidad de hacer una extracción previa con solventes orgánicos. El éxito en la aplicación de este método depende de la relativa alta fluorescencia del complejo Retinol-RBP a la longitud de onda de excitación de 335 nm, comparada con la de Retinol libre. Debido a que el suero sólo tiene que ser diluido antes de medir la fluorescencia, el costo de los reactivos es mínimo (11).

El método es útil para análisis de rutina de control de calidad y en nivel nutricional de leche entera o fortificada, y productos lácteos, ya que en estos productos hay pequeñas cantidades de productos de interferencia. La parte de vitamina A que corresponde a carotenoides de pro-vitamina A no puede ser medida por este método (1).

III.6.3 Método colorimétrico

1) Tricloruro de antimonio.

Principio .- El método está basado en la medición del color azul obtenido como resultado de la reacción de vitamina A con el tricloruro de antimonio (o algún otro ácido de Lewis). La absorbancia en este complejo se encuentra alrededor de los 629 nm y está en función de la concentración de vitamina A. La lectura es esencialmente para Retinol, los isómeros de Retinol, o Retinil ésteres pueden ser determinados, pero los colores desarrollados por Retinaldehído, dehidroretinol y

compuestos similares presentan absorbancia máxima a longitudes de onda mayores de 360 nm. Los carotenoides reaccionan más lentamente que la vitamina A, formando coloración verde-azulosa que absorbe a longitudes de onda más cortas, por lo que en la aplicación de este método los carotenoides tienen que ser previamente eliminados (1).

El método es utilizado por su simplicidad y rapidez y para evitar el uso de solventes caros, volátiles o tóxicos, al mismo tiempo que da resultados satisfactorios; sin embargo el uso del tricloruro de antimonio como reactivo, es corrosivo y debe ser usado con mucho cuidado y puede ocasionar daños al equipo; la formación del oxiclorigenol de antimonio, hace muy difícil la limpieza del aparato y de las celdas y por si fuera poco el color azul que se forma es muy inestable y es necesario tomar la lectura entre los 5 y 10 primeros segundos después de la adición del reactivo (18).

Algunos puntos críticos del método son: libertad de la mezcla con tricloruro de antimonio, un fotómetro bien calibrado, que dé lecturas directas y con baja intensidad de radiación a 620 nm (1).

2) Anhidrido maleico.- El anhidrido maleico reacciona con todos los isómeros trans y 9-cis isómeros, para formar aquellos compuestos que no dan color azul con el tricloruro de antimonio (15). La actividad de la mezcla de isómeros de vitamina A puede ser calculada tomando en cuenta las relativas biopotencias de sus componentes, ya que primero se hace reaccionar la mezcla con anhidrido maleico, que reacciona con los cis y trans-isómeros formando un producto adicional que evita la reacción con el tricloruro de antimonio (1).

III.6.4 Cromatografía de líquidos de alta presión

Principio.-Es el método más nuevo para la determinación de vitamina A. Las principales ventajas del método son: la relativa rapidez, buena separación de los componentes, algunos costos y peligros se reducen debido a las pequeñas cantidades de reactivos que son utilizados, los isómeros pueden ser separados más fácil y más exactamente que con otros métodos; el método puede ser modificado e incluir otras vitaminas liposolubles, incluyendo los carotenoides de provitamina A (4).

Las muestras son preparadas, hidrolizadas y extraídas en forma similar a los métodos anteriormente mencionados. Una pequeña alícuota del extracto que contiene vitamina A es inyectada en una columna corta y de diámetro pequeño, empacada con pequeñas y finas partículas del absorbente; la vitamina A es rápidamente eluidas por una mezcla de solventes a presión. Al mismo tiempo que los componentes son absorbidos, son monitoreados y medidos continuamente por un espectrofotómetro; parte integral de este aparato. Los resultados son obtenidos gráficamente y los componentes son identificados por los tiempos de retención de los picos de elución comparados con un estándar conocido. Los datos de la gráfica son usados para calcular la concentración o son dados por una computadora integrada (3).

La vitamina A y sus derivados se encuentran en la naturaleza como compuestos que tienen rangos muy diferentes de polaridad o como compuestos no polares como los ésteres y el ácido retinóico y sus derivados solubles en agua (retinol beta glucuronidos). Debido a esto, el análisis de retinoles en tejidos biológicos da un excelente ejemplo de la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta polaridad en una sola corrida (12). Otro ejemplo de la aplicación de la cromatografía de líquidos es en la determinación de retinol, alfa-tocoferol y beta-caroteno en suero utilizando longitud de onda programada ultravioleta/visible y detección amperométrica-electroquímica con un electrodo de carbón (25). La cuantificación de

vitamina A y E en muestras de suero o plasma puede ser determinada por clarificación y HPLC; las proteínas del suero son desnaturalizadas con la adición de acetonitrilo conteniendo acetato de alfa-tocoferol (estándar interno) y las vitaminas son extraídas subsecuentemente con una matriz orgánica consistente en acetato de etilo:butanol (1:1) sin necesidad de evaporar los solventes orgánicos, y procediendo después a la elución de las muestras en una fase móvil de metanol-agua (95:5) (33). Un método muy rápido y muy sensible que existe para la determinación de vitamina A y acetato de vitamina A es la utilización de HPLC con un detector fluorométrico. La detección de estos dos compuestos se puede hacer a la longitud de onda de excitación de 348 nm y de emisión de 470 nm. Las muestras de plasma son empleadas para evaluar la exactitud, reproducibilidad y aplicabilidad del método. Menos de un nanogramo de vitamina A en el plasma puede ser cuantificado por medio de este método (8).

IV. PARTE EXPERIMENTAL

El experimento se hizo con el objeto de probar el comportamiento de absorción de la Vitamina A contenida en la formulación desarrollada en este trabajo, comparada contra otra de referencia, ya existente en el mercado. Las dos fórmulas mencionadas contienen la misma cantidad de ingrediente activo.

Es importante mencionar que por razones de seguridad de los laboratorios involucrados, de aquí en adelante la fórmula desarrollada para este trabajo se llamará de "prueba", y la fórmula que ya existe en el mercado y que será tomada como comparativa, se le llamara de "referencia"

IV.1 Aparatos y materiales.

- Fluorómetro
- Centrifuga
- Microjeringas de 500 ul.
- Tubos de centrifuga de 2 ml.
- Agitador mecánico. (bortex)
- Pipetas volumétricas de 0.5, 0.1 y 2.0 ml.
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Tubos de ensaye
- Jeringa vacutainer
- Tubos vacutainer
- Jaulas de acrílico con tapa y fondo de malla de metal. (fig 1 y 2)
- Bebederos especiales para el tipo de jaula a utilizar.
- Tijeras de disección
- Tabla de disección
- Homogeneizador para tejidos.



Fig 1.- Jaulas individuales de acrílico con tapa de malla de metal y bebederos especiales.

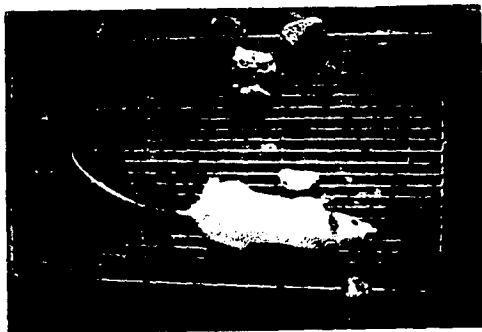


Fig 2.- Fondo de malla de metal que evita que los animales se coman las heces fécales.

IV.2 Material Biológico y reactivos.

- *Ratas macho de la cepa Wistar de 21 +/- 1 día de nacidas.*
- *Agua*
- *Formúla de Vitamina A hidromiscible de prueba.*
- *Fórmula de Vitamina A hidromiscible de referencia.*
- *Tiamina*
- *Piridoxina*
- *Pantotenato de Calcio*
- *Acido Nicotínico*
- *Collina (cloruro)*
- *Biotina*
- *Acido Fólico*
- *Inositol*
- *Acido p-amino benzóico*
- *Vitamina K*
- *Vitamina B12*
- *Alcohol 95o.*
- *Acido Acético concentrado.*
- *Caseína*
- *Aceite de semillas de algodón*
- *Sacarosa*
- *Almidón*
- *L-Metionina*
- *Vitamina D*
- *Carbonato de Calcio*
- *Fosfato dibásico de potasio*
- *Sulfato de Magnesio*

- Cloruro de sodio
- Citrato férrico
- Yoduro de potasio
- Sulfato de manganeso
- Sulfato de cobre
- Cloruro de Zinc
- Etanol
- Hexano

IV.3 Diseño del experimento

Para el experimento se utilizaron ratas macho recién destetadas de la raza Wistar, con un peso promedio de 56 +/- 5 g.

Para el ensayo se utilizó un lote de 48 animales colocados en jaulas de acrílico (fig. 1) con fondo de malla. Al inicio del periodo experimental, se sacrificaron seis de estos animales, haciéndoles primero una punción cardiaca para la obtención de sangre, y después decapitándolas para hacer la disección y obtener el hígado (fig. 3); y se obtuvieron las 12 muestras necesarias para la determinación de Vitamina A en hígado y suero por método fluorométrico, ya que el hígado es almacén de la Vitamina A y la sangre el vehículo de la misma. Dichas muestras fueron guardadas al abrigo de la luz.

Las 42 ratas restantes fueron alimentadas ad libitum (fig. 4), por seis semanas (periodo de depauperación que se considera suficiente para que las ratas consuman sus reservas de vitamina A), con una dieta carente de Vitamina A pero adecuada cuantitativa y cualitativamente en todos los otros nutrientes esenciales para la rata.

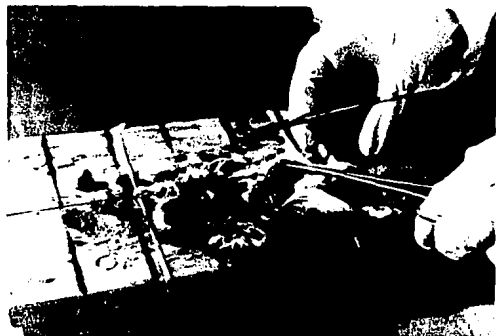


Fig 3.- Extracción de hígado para la valoración de palmitato de retinol en suero.

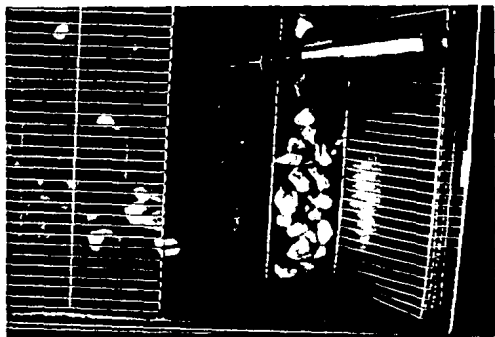


Fig 4.- Ratas alimentadas ad libitum con una dieta carente de vitamina A

Los componentes de esta dieta fueron:

| | |
|---------------------------------|------------|
| - Caseína | 18% |
| - Aceite de semillas de algodón | 5% |
| - Sales Minerales | 4% |
| - Sacarosa | 10% |
| - Almidón | 62.7% |
| - L-Metionina | 0.3% |
| - Vitamina D | 0.4% |
| - Solución de Vitaminas: | 50 ml/kg |
| + Tiamina | 0.6 g/lit |
| + Piridoxina | 0.6 g/lit |
| + Pantotenato de Calcio | 0.6 g/lit |
| + Acido Nicotínico | 1.0 g/lit |
| + Colina (Cloruro) | 30 g/lit |
| + Biotina | 2 mg/lit |
| + Acido Fólico | 4 mg/lit |
| + Inositol | 8 g/lit |
| + Acido p-amino benzóico | 6 g/lit |
| + Vitamina K | 1 mg/lit |
| + Vitamina B12 | 0.6 mg/lit |
| + Alcohol 95o | 840 ml/lit |
| + Acido Acético Concentrado | 100 ml/lit |
| + Agua Destilada C.S.P. | 1000 ml |

Composición de sales minerales:

| | |
|-------------------------------|-------|
| * Carbonato de Calcio | 32.5% |
| * Fosfato dibásico de Potasio | 35.0% |
| * Fosfato de Calcio | 8.1% |
| * Sulfato de Magnesio | 2.9% |
| * Cloruro de Sodio | 18.2% |
| * Citrato Férrico | 2.9% |
| * Yoduro de Potasio | 0.08% |
| * Sulfato de Manganeso | 0.27% |
| * Sulfato de Cobre | 0.03% |

Para la preparación de la vitamina, se hace una solución al momento de la preparación del alimento, con objeto de facilitar su integración con los demás elementos de la dieta. Se disuelve el inositol y el ácido p-amino benzóico en agua destilada caliente, luego se añade el resto de las Vitaminas disueltas en otro volumen de agua destilada. Añadir el alcohol, el ácido acético y llevar a volumen con agua destilada.

Los componentes de la dieta deben de ser pesados cuidadosamente y después integrarlos perfectamente en una mezcladora para asegurar su homogeneidad; posteriormente se forma un granulado y se hacen trociscos con la mezcla, para que puedan ser roídos por las ratas. Las dietas deben ser mantenidas en un lugar fresco y en recipientes cerrados para su mejor conservación. El alimento será colocado posteriormente en la parte superior de la jaula para que pueda ser tomado por los animales ad-libitum.

Al final de las seis semanas de consumir la dieta libre de Vitamina A, se sacrificarán seis animales al azar y se determinará en ellos retinol en hígado y en suero, para comprobar la concentración de vitamina A en los animales después del periodo de decauperación.

El resto de los animales se distribuyeron en tres subgrupos al azar, de doce animales cada uno. Los tratamientos de cada grupo son los siguientes: (fig. 5)

GRUPO 1:

Dieta A. Dieta sin Vitamina A. Esta dieta contiene todos los nutrientes de la dieta exeputando vitamina A.

GRUPO 2:

Dieta A + 10% en peso de sacarosa fortificada con 15 ug (50 U.I) de vitamina A, la cual fue agregada en el momento de dar el alimento a los animales. Esta dieta contiene la fórmula a probar.

GRUPO 3:

Dieta C. Dieta control con Vitamina A. Esta Dieta contiene 10% en peso de azúcar fortificada con 15 ug (50 U.I) de Vitamina A de referencia por gramo de azúcar. Esta dieta contiene la fórmula de referencia.

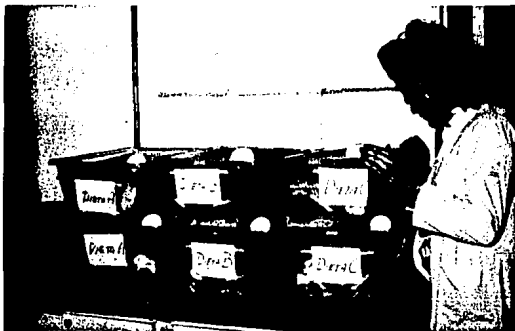


Fig. 5 - Separación de los animales de acuerdo a la dieta correspondiente.

Las ratas se alimentaron con estas dietas por un periodo de 5 semanas y seis animales de cada grupo se sacrificarán en cada periodo por decapitación a las 3 y 5 semanas de iniciada la prueba.

Los parametros a evaluar son: peso corporal, peso del hígado, retinol en suero sanguíneo y retinol en hígado.

Durante el periodo del experimento (11 semanas) se pesan las ratas dos veces por semana y se registra este peso como una medida de control.

Se considerará el ensayo satisfactorio , cuando los patrones de crecimiento y de recuperación de retinol en hígado sea mayor o igual al 95% de los resultados obtenidos en la preparación de palmitato de Vitamina A de referencia.

El siguiente esquema muestra la distribución y los periodos de sacrificio de los animales en experimentación:(fig. 6)

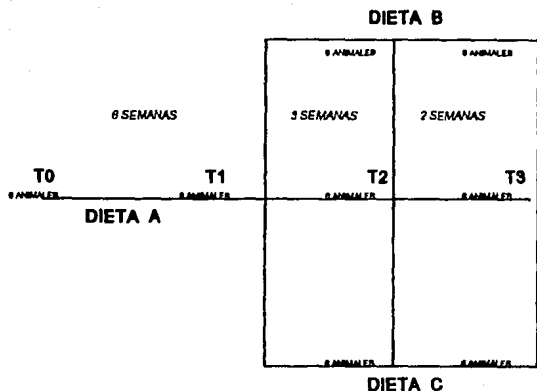


Fig 6.- Distribución de animales y tiempos de acuerdo al protocolo original.

IV.4 Valoración del Palmitato de Retinol.

Para la valoración de retinol, tanto en suero como en hígado, se eligió el método fluorométrico, considerado el más adecuado y sensible a la concentración de vitamina A en las muestras que se van a trabajar, ya que se puede detectar hasta un microgramo de retinol por gramo o por mililitro de muestra (1).

IV.5 Metodología

*Nota: Todo el método fluorométrico, se llevó a cabo con material protegido de la luz.

1.- Las ratas utilizadas para el muestreo son pesadas previamente, registrando su peso.

2.- Se anestesian las ratas con eter, y enseguida se hace una punción cardiaca para obtener las muestras de sangre.

3.- Una vez realizada la punción cardiaca, los animales son desnucados y disecionados, con el fin de extraer el hígado (fig.7). Después de que el hígado es extraído del animal, es colocado en un vaso de precipitados tapado, se pesa y se conserva en hielo seco, mientras se trata para su valoración. (fig 8)

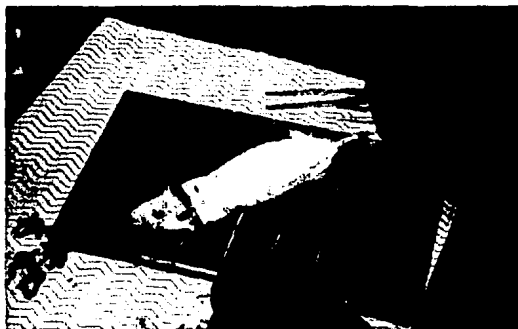


Fig. 7.- Rata desnucada, para realizar la extracción del hígado.



Fig. 8.- Hígado extraído y listo para ser homogeneizado. Antes de esto es pesado y conservado en hielo seco.

4.- Una vez extraídas las muestras, la sangre se incuba a 37 grados C durante 30 min., para obtener la retracción del coágulo (fig. 9); pasado este tiempo, los tubos se centrifugan a 3,000 r.p.m. durante 10 min.; el coágulo se desecha y el suero se guarda en tubos de ensayo tapados y se coloca en el refrigerador. El hígado se pesa y se homogeneiza con una solución buffer de fosfatos (S.B.F.) 0.5 M al 10% p/v ; el homogeneizado debe tener un pH = 7.5.



Fig. 9.- Extracción de sangre por punción cardíaca, para después obtener el coágulo por retracción del coágulo.

5.- Medir una alícuota de 1 ml. del homogenizado y transferir a un matraz aforado de 10 ml.; aforar con S.B.F.

6.- En tubos de ensayo de 2 ml., con tapón y marcados como H1, H2, S1 y S2 adicionar:

- A los tubos marcados con el no. 1 adicionar 60 μ l de una solución estándar de palmitato de Vitamina A contenido 0.9 mg/ml.

- En cada uno de los tubos adicionar 0.5 ml de hígado homogenizado y suero respectivamente.

7.- Extraer por agitación con 0.5 ml. de etanol cada uno de los tubos para precipitar las proteínas de la sangre, durante 15 min.

8.- Hacer 3 extracciones de 0.5 ml. de hexano c/u, agitando durante 15 min. en cada caso; juntar los extractos orgánicos, para llevar a un volumen final de 3ml (volumen necesario para poder tomar la lectura en el fluorómetro).

9.- Medir una alícuota de 0.5 ml. del hexano y adicionar 2.5 ml de benceno para llevar a un volumen final de 3 ml. (volumen necesario para poder tomar la lectura en el fluorómetro)

10.- Determinar la fluorescencia de cada una de las muestras en un fluorómetro adecuado, a 350 nm. de excitación y 450 nm de emisión.

11.- Obtener la concentración de retinol por g de hígado y por ml de suero, leyendo en una curva patrón (U.F. vs concentración de retinol en ug/ml) hecha con el mismo estándar, con 5 concentraciones diferentes.

IV.6 Comprobación del método analítico

Con el fin de comprobar los métodos de extracción y valoración de los niveles de Vitamina a, se realizó un estudio que consistió en determinar el contenido de palmitato de retinol tanto en el suero como en el hígado de 30 ratas macho de la cepa Wistar de 21 +/- 1 días de edad.

Los resultados obtenidos fueron:

CUADRO NO. 1
DETERMINACION DE VITAMINA A TOTAL EN SUERO E HIGADO DE RATAS
MACHO.

Edad: 21 dias

Cepa: Wistar

| No. Ratas | Fuente | Concentra- ción vit A. ug/ml y ug/g | E.E. | C.V. | P99% | |
|-----------|--------|---|------|------|------|-----|
| | | | | | LS | LI |
| 13 | Suero | 1.4 +/- 0.33 | 0.09 | 23 | 1.7 | 1.1 |
| 19 | Higado | 85 +/- 14 | 4.7 | 16 | 101 | 69 |

V. RESULTADOS DEL PRIMER EXPERIMENTO

Siguiendo el protocolo anteriormente mencionado los animales fueron alimentados durante 6 semanas con la dieta carente de Vitamina A (grupo 1), realizando el sacrificio de seis animales en este momento para valorar la pérdida de vitamina A. Posteriormente se dividió el lote de animales en tres grupos administrándoles dieta control (grupo 1), dieta a probar (grupo 2) y dieta de referencia (grupo 3) durante 3 semanas más, realizando entonces el sacrificio de los animales restantes. Se obtuvieron los siguientes resultados:

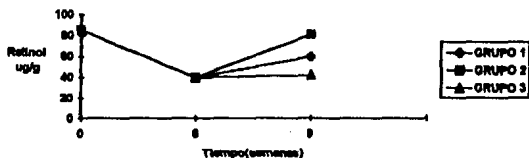
CUADRO NO.2
CONTENIDO PROMEDIO DE VITAMINA A

| GRUPO NO. | TIEMPO (semanas) | PESO (gramos) | VIT. A EN HIGADO (ug/g) | VIT. A EN HIGADO (ug/higado) | VIT. A EN SUERO (ug/ml) |
|--------------|---------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 0 | 70 | 85 | 370 | 1.4 |
| | 6 | 77 | 40 | 218 | 1.2 |
| | 9 | 88 | 60 | 223 | 2.2 |
| 2 | 9 | 96 | 81.2 | 410 | 2.1 |
| 3 | 9 | 99 | 42.7 | 202 | 3.3 |

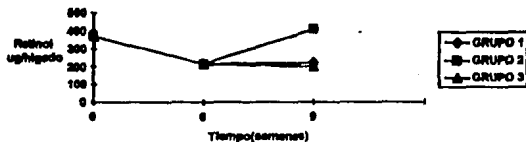
* Nota: La semana número 9 corresponde a la tercera semana después de que se empezaron a plicar las dietas con la Vitamina A correspondiente.

A continuación se presentan gráficas de la variación de vitamina A en hígado (gráfica no.1 y 2) y suero (gráfica no.3) de los mismos y las gráficas de variación de peso de las tres dietas (gráficas 4, 5 y 6) durante el período experimental.

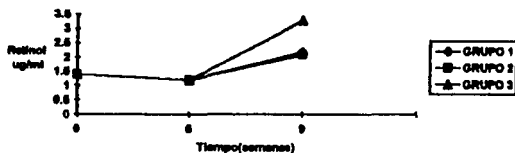
CONTENIDO DE RETINOL EN HIGADO.
Gráfica 1



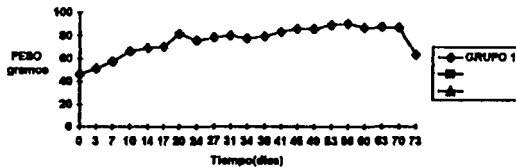
CONTENIDO DE RETINOL EN HIGADO.
Gráfica 2



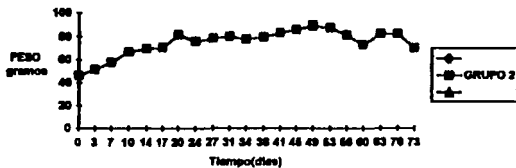
CONTENIDO DE RETINOL EN suero.
Gráfica 3



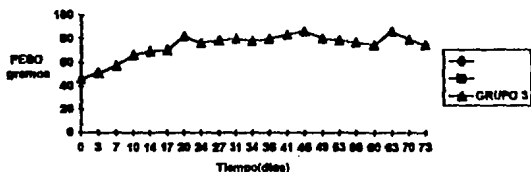
VARIACION DE PESO GRUPO 1
Gráfica 4



VARIACION DE PESO GRUPO 3
Gráfica 5



VARIACION DE PESO GRUPO 3
Gráfica 6



*Nota: En las gráficas no. 4, 5 y 6, la variación de peso está reportada en días y no en semanas, como es el caso de las demás gráficas, debido a que se tomó registro del peso de los animales cada tres días.

V.1 Discusión de resultados

1) Contenido de retinol en microgramos por gramo de hígado:

Los niveles de Vitamina A durante las primeras 6 semanas del experimento, disminuyeron drásticamente, de 85 a 40 ug por gramo de hígado en el grupo 1, obteniéndose un aumento en dichos niveles durante las siguientes 3 semanas, seguramente debido a que los animales recuperaron los niveles de Vitamina A, a causa del canibalismo que hubo entre ellos. El grupo 2 también demostró un importante incremento en los niveles de vitamina A, sin embargo, el grupo 2 se mantuvo con la misma concentración de retinol con la que se inició la segunda parte del experimento, que fue la administración de dietas con vitamina A.

(Gráfica No. 1)

2) Contenido de retinol por hígado:

Se puede observar que los niveles de Vitamina A durante las primeras 6 semanas en el hígado de los animales del grupo 1, disminuyeron de 360 ug a 210 ug manteniéndose después una meseta constante durante las tres semanas subsecuentes del experimento. Durante este último periodo los niveles de Vitamina A en el hígado total de los animales del grupo 3 continúan disminuyendo a una velocidad menor; en los animales del grupo 2 se observa una elevación de dichos niveles de Vitamina A. (Gráfica No. 2)

3) Contenido de retinol en suero:

En relación con los niveles de Vitamina A en suero expresados como ug/ml, se observa una disminución menos marcada que en el caso del hígado total que va de 1.4 ug a 1.2 ug. en suero. (Gráfica No. 3).

La administración de Vitamina A tanto del grupo 2 como del grupo 3, indujeron un incremento en los niveles séricos de Vitamina A, siendo estos niveles mayores en los animales del grupo 3. El incremento de Vitamina A en el suero de los animales alimentados con Dieta A, resulta un tanto inexplicable, pero muy probablemente se debe al canibalismo que se observó entre los animales del grupo 1.

4) Variación de peso:

Durante la primera parte del experimento la caída de peso fue muy drástica, logrando posteriormente una ligera recuperación y estabilidad de peso en los últimos días de la primera parte del estudio. En la segunda parte del experimento fue relativamente diferente, pero es importante tomar en cuenta que el peso inicial de los animales no fue uniforme, y debido a esto los animales con mayor peso, tuvieron ventaja sobre los menos pesados provocando diferencias de peso muy

marcadas. De cualquier forma la variación de peso se comporta de forma proporcional entre los dos grupos. (Graficas No. 4.5 y 6).



Fig. 11.- El crecimiento de los animales fue muy deficiente, por lo que el tamaño de estos después de 40 días de experimentación fue casi el mismo que al principio del experimento. Se puede observar además que la rata ha perdido pelo durante dicho periodo.

V.2 Observaciones.

Los animales consumieron agua y alimento regularmente, manteniéndose estas condiciones durante toda la primera parte del experimento. En el momento de hacer la valoración en la dieta A, a las seis semanas de iniciado el experimento, se obtuvo una disminución del 53% en los niveles de Vitamina A en hígado y 30% en suero, como se esperaba, pero sin embargo los animales presentaron los siguientes problemas:

Aproximadamente a las 6 semanas las ratas tuvieron que ser cambiadas del Bioterio en el que estaban instaladas, y después de este cambio, las ratas se

notaban visiblemente estresadas, lo cual provocó que los animales se atacaran entre sí. A los 4^{er} días las ratas mostraron un comportamiento anormal: anorexia, inmovilidad (fig. 12 y 13), caminado lento y torpe, ojos casi completamente cerrados (fig. 14), lesiones en la piel (fig 15) y finalmente la muerte. (fig. 11)



Fig. 12.- Ratas completamente inmóviles.

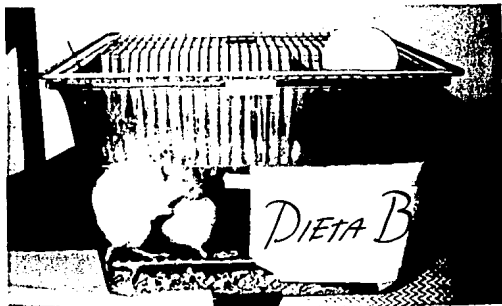


Fig. 13.- Agrupamiento de los animales, muy probablemente debido a que tenían frío por causa de la neumonía.



Fig. 14.- Caminado lento, movimientos muy torpes y ojos casi completamente cerrados.



Fig. 15.- Laciones en la piel.

Para poder determinar la posible causa de la muerte, se realizo la necropsia con el auxilio de un Médico-Veterinario-Zootecnista, detectando lo siguiente:

Congestión pulmonar y hepática (fig. 16, 17 y 18)

Hemorragias internas

Dermatitis



Fig. 16.- Congestión pulmonar y hepática.



Fig 17.- Derecha: pulmón congestionado. Izquierda: pulmón normal

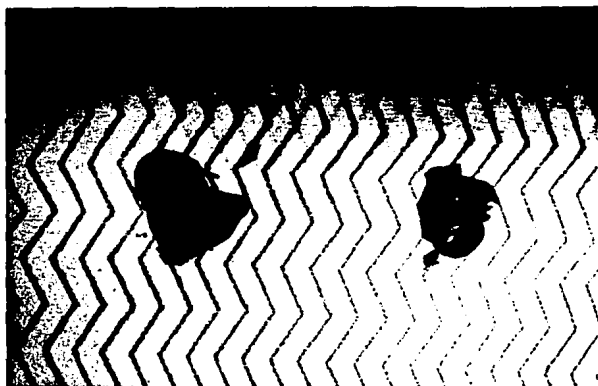


Fig. 18 - Derecha: Hígado congestionado. Izquierda: Hígado normal.

Por lo tanto se concluye que las ratas murieron a consecuencia de Neumonía.

Posterior a la necropsia, se realizo un examen histopatológico de hígado, pulmon y piel.

El reporte de dicho examen fue el siguiente:

| MUESTRA | RESULTADO |
|------------|--|
| A1. PULMON | Neumonía Intersticial Moderada Difusa no superada. |
| B1. HIGADO | Congestion hepatica Conlitolillar |
| C1. PIEL | Hiperqueratosis moderada difusa |

Se concluye así mismo que el proceso infeccioso de Neumonía se desarrolló debido a las bajas defensas de los animales , principalmente por deficiencia de Vitamina A en una cepa que normalmente tiende a presentar este tipo de enfermedades.

V.3 Propuesta

Debido a todos los problemas que se suscitaron durante la realización del experimento, se consideró necesario hacer algunas modificaciones al protocolo original, con objeto de poder llegar de forma satisfactoria al término del experimento. Dichas modificaciones fueron las siguientes:

- 1) Manejar tres ratas por jaula, colocando divisiones para que las ratas estén aisladas y evitar así el posible canibalismo.(fig.20)*
- 2) El período de carencia de Vitamina A, se reduce a 4 semanas.*
- 3) Administrar un tratamiento con antibiótico durante 5 días, para eliminar el proceso infeccioso.*
- 4) Administrar la Vitamina A en el agua y no en el alimento, con el fin de asegurar su ingestión.*
- 5) Los periodos de administración de Vitamina A serán de 2 semanas.*
- 6) Los animales serán desnucados para su sacrificio. (fig.19)*



Fig. 19.- Decapitacion de los animales para obtencion de sangre y cuantificacion de retinol en suero.

VI. RESULTADOS DEL SEGUNDO EXPERIMENTO

El segundo experimento realizado, se llevó a cabo bajo las mismas condiciones propuestas en el protocolo, efectuando las modificaciones anteriormente mencionadas, obteniéndose los siguientes resultados:

CUADRO NO. 3

CONTENIDO PROMEDIO DE VITAMINA A

| GRUPO NO. | TIEMPO (semanas) | PESO (gramos) | VIT. A EN HIGADO ($\mu\text{g/g}$) | VIT. A EN HIGADO ($\mu\text{g/higado}$) | VIT. A EN SUERO ($\mu\text{g/ml}$) |
|--------------|---------------------|------------------|--|---|--|
| | 0 | 79.83 | 23.2 | 88.9 | 1.41 |
| 1 | 4 | 74.8 | 1.02 | 3.12 | 1.26 |
| 2 | 6 | 78.43 | 33.6 | 114.2 | 2.7 |
| | 8 | 82.3 | 98.5 | 552.1 | 2.5 |
| 3 | 6 | 105.5 | 28.73 | 148.5 | 2.46 |
| | 8 | 114.3 | 98.06 | 372.5 | 2.41 |



Fig. 20.- Colocacion de dos a tres ratas por jaula, con separaciones individuales.

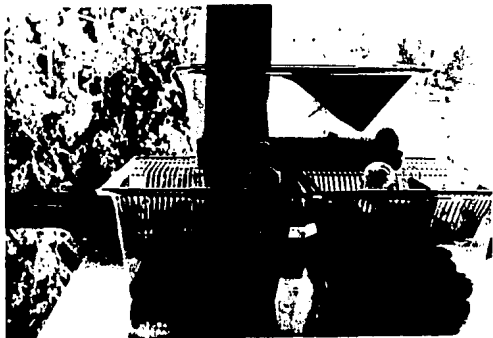


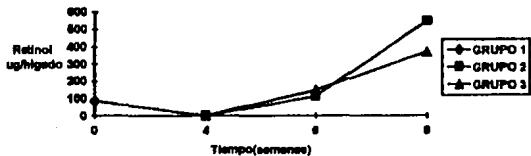
Fig. 21.- Se presenta por segunda vez el comportamiento de inmovilidad en algunos de los animales.

A continuación se presentan gráficas comparativas de variación de peso y contenido de retinol en suero e hígado.

CONTENIDO DE RETINOL EN HIGADO.
Gráfica 7



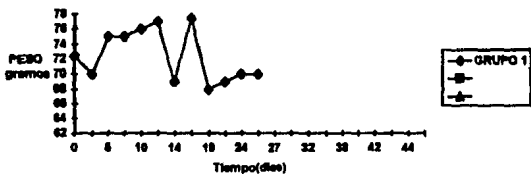
CONTENIDO DE RETINOL EN HIGADO.
Gráfica 8



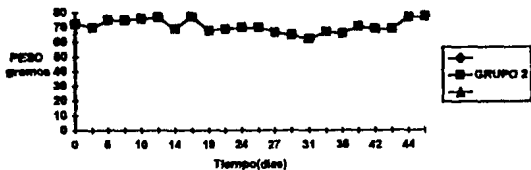
CONTENIDO DE RETINOL EN suero.
Gráfica 9



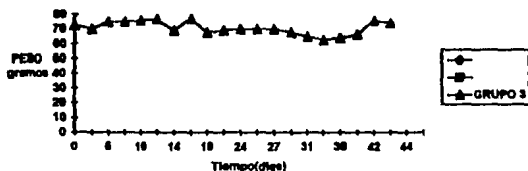
VARIACION DE PESO GRUPO 1
Gráfica 10



VARIACION DE PESO GRUPO 2
Gráfica 11



VARIACION DE PESO GRUPO 3
Gráfica 12



VI.1 Discusión de resultados.

1)Peso:

En las primeras cuatro semanas del experimento, los animales del grupo 1 tuvieron un aumento de peso del 7% en promedio, por lo que puede concluirse que se mantuvieron en su peso inicial y que al ser animales en crecimiento debieron de haber crecido más, pero no fue así debido a que la falta de vitamina A provocó un retardo en el crecimiento de los mismos.

Durante las siguientes cuatro semanas del experimento el aumento de peso en los grupos 2 y 3 fue más significativo, siendo en este caso de un 15% aproximadamente, pero lo más importante en este punto es que el patrón de crecimiento entre los dos grupos es muy similar (Gráficas No. 10, 11 y 12).

2) Contenido de retinol en microgramos por gramo de hígado:

Durante las primeras 4 semanas que duró la fase de carencia alimenticia de Vitamina A la concentración de retinol disminuyó hasta obtenerse una concentración prácticamente nula de retinol. A los 14 días de administrar la dieta con Vitamina A en los grupos 2 y 3, el contenido de Vitamina A se incrementó a 33 y 28 ug/g y a los 20 días se elevó a 98.5 y 98 ug/g respectivamente. (gráfica no. 7)

3) Contenido de retinol en microgramos por hígado:

La concentración de retinol por hígado, tuvo un comportamiento muy semejante al que presentó la concentración de retinol, por gramo del mismo, sin embargo, durante la última fase del experimento, se puede observar que el contenido de retinol por hígado es mayor en el grupo 2 que en el grupo 3, debiéndose esto únicamente a que el peso promedio del hígado del grupo 2 es mayor al del grupo 3 y por lo tanto la concentración es mayor. (gráfica no.8).

4) Contenido de retinol en suero:

Durante las primeras 4 semanas del experimento, la disminución de retinol en suero, no fue tan drástica, como en el caso del hígado, presentándose una disminución de 0.89%. Sin embargo en las siguientes 2 semanas que se empezó a administrar la dieta con Vitamina A, la concentración obtenida fue de 2.70 y 2.46 ug/ml, y a los veinte días, dicha concentración fue de 2.49 y 2.41 ug/ml en los grupos 2 y 3 respectivamente (Gráfica no.9).

VII. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

1) Al aplicar una dieta carente de Vitamina A a los dos grupos de animales comparados se logró disminuir satisfactoriamente la cantidad de Vitamina A en el organismo.

Sin embargo esta carencia de Vitamina A trajo consigo algunas consecuencias negativas para el experimento, como fueron la baja en las defensas de los animales y la muerte de algunos de ellos, al ser atacados por agentes infecciosos, como el de la Neumonía, que es endémica en esta raza. Al perder a casi todos los animales en el primer experimento, fue necesario repetir el experimento realizando algunas modificaciones tales como:

- a) Administrar la Vitamina A en el agua y no en el alimento.*
- b) Aplicar un tratamiento con antibiótico para abatir el riesgo de mortandad.*
- c) Reducir el periodo de carencia alimenticia a 26 días. Así mismo, los periodos de administración de Vitamina A fueron de 15 días c/u.*
- d) Manejar tres ratas por jaula, colocando divisiones para mantenerlas aisladas.*

Al mismo tiempo la deficiencia de Vitamina A permitió observar las consecuencias que acarrea la deficiencia de la Vitamina, como lo son: la dermatitis, la poca resistencia a las enfermedades, la ceguera y la necesidad orgánica que las llevó al canibalismo.

2) Después del periodo de carencia alimenticia la absorción del palmitato de retinol en los dos grupos fue muy significativa, y lo que es más importante, el

comportamiento de absorción es muy semejante, no habiendo entre las dos dietas una diferencia mayor al 5% tanto en la absorción en hígado, como la absorción en suero.

3) Se puede concluir que la fórmula hidromiscible de palmitato de retinol a prueba tiene un patrón de comportamiento muy semejante a la fórmula de comparación, y por lo tanto es Bioequivalente en las condiciones efectuadas del estudio.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Augustin J.; Klein B.P.; Becker D.A. and Venugopal P.B. "Methods of Vitamin Assay" ed. Wiley Interscience. 4th. Edition. 1985.
- 2) Badui S.D. "Química de los Alimentos". Ed. Alhambra Universidad.
- 3) Bankson D.D.; Russell R.M.; Sadowski J.A.: "Determination of retinyl esters and retinol in serum or plasma by normal-phase liquid chromatography: method and applications." *Clin. Chem. Jan 1986*, 32 (1 Pt 1) p 35 - 40.
- 4) Biesalski H.; Greiff H. Brodda K.; Hafner G.; Bassler K.H.: "Rapid determination of Vitamin A (retinol) and Vitamin E (alpha-tocopherol) in human serum by isocratic adsorption HPLC." *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 1986, 56(4) p 319-27.
- 5) Bollag W. "Retinoids and Cancer" *Cancer Chemother Pharmacol* 3:207-215, 1979.
- 6) Braverman J.B.S. "Bioquímica de Alimentos" Ed. el Manual Moderno.
- 7) Chytil F. and Ong D.E. "Cellular Retinol and Retinoic Acid Binding Proteins in Vitamin A action" *Fed. Proc.* 38: 2510-2514, 1979
- 8) Collins C.A. and Chow Ch. K. "Determination of Vitamin A and Vitamin A acetate by HPLC with fluorescence detection" *J. Chrom.* 317 (1984) 349 - 354.
- 9) Cooper A.D. and Y. P.V.S. "Rates of removal and Degradation of Chylomicron Remnants by Isolated Perfused Rat Liver" *J. Lipid Res.* 19:635-643, 1978.
- 10) "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas" P.L.M. 35ava. Edición Mexicana, 1989.
- 11) Driskell W.J.; Hewett J.S. and Bashor M.M. "Evaluation of a direct fluorometric method for determination of serum retinol". *Clin Chem. Vol 32, No. 5*, 1986.

- 12) " Esterification of all-trans retinol and its isomerization to 11-cis retinol " *Nutr. Rev.* 1990, Mar;48(3): 166-8.
- 13) " Food and Nutrition Board: Recommended dietary allowances " Ninth revised edition. National Academy of Science, National Research Council, 1980.
- 14) Furr H.C.; " The effects of dietary fatty acid composition on liver retinyl ester composition in the rat" *J. Nutr.* 1989 Apr; 119(4): 581-5
- 15) Furr H.C.; " The effects of dietary fatty acid composition on liver retinyl ester composition in the rat" *J.Nutr.* 1989 Apr;119(4):581-5.
- 16) Gerlach T.; Biesalski H.K.; bassler K.H.: " Serum Vitamin A determinations and their value in determining Vitamin A status." *Phys. Chems. Ins. Marm* 1988, 27(1) p 57 - 70.
- 17) *Handbook on Human Nutritional Requirements" World Health Organization Monograph. Serie No. 61, Genova, 1974.*
- 18) Hashmi M.U.H. " Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations. Ed. Jhon Wiley and Sons. 1973.
- 19) Heller J. " Characterization of rat liver cytosol retinyl ester lipoprotein complex." *Arch. Biochem. Biophys.* 198: 562-571, 1979.
- 20) Kaplan-Pesce. "Quimica Clinica", 1988. Ed. Panamericana: 776-81
- 21) Kailson B., B.A. Underwood and J.D. Loerch: " Effects of retinoic acid on the mobilization of Vitamin A from the liver of rats." *J. Nutr.* 109: 787-795, 1979.
- 22) Lenhinger. "Bioquimica" Ed. Omega. Barcelona España. 10ma. reimpression, 1985: 538 -562.
- 23) Leo M.A.; Kim Ch.L.; Lieber, Ch. S. "Role of Vitamin A degradation in the control of the hepatic levels in the rat". *J. Nutr.* 1989, March.
- 24) Lewis K.C.; Green J.B.; Lech L.A.; "Retinol metabolism in rats with low Vitamin A status: a compartmental model. *J. Lipid Res.* 1990, Sept.; 31(9): 1535 - 48.

- 25) MacCrehan W.A.; Schonberger E.: 'Determination of retinol, alfa-tocopherol, and beta-carotene in serum by liquid cromatogrphy with absobance and electrochemical detection." *Clin. Chem. Sept 1987, 33(9) p 1585 - 92.*
- 26) Mahoney C.P.;Margolis M.T.; Kauss T.A.; and Labbe R.F.: "Chronic Vitamin a Intoxication in Infants Fed Chicken Liver". *Pediatrics 65:893-896,1980.*
- 27) " Masked Hipervitaminosis and Liver injury". *Nutrition Reviews 40:303-305,1982*
- 28) McAlpin A.S.; Sawyer L. " Beta-lactoglobulin a protein drug carrier?" *Biochem soc. trans.1990 Oct: 18(3):879.*
- 29) Mejia L.A.; Arroyave G. "The effect of Vitamin A fortification of sugar on iron metabolism in preschool children in Guatemala".*J. Clin. Nutr. 36: july 1982, pp 87-93*
- 30) Moore T. " Vitamin A" Elsevier, Amsterdam, 1957
- 31) Muto Y.; Smith J.E.; mlch P.O. and Goodman D.S. "regulation of retinol binding protein metabolism by Vitamin A status in the rat". *J. Biol. Chem. 247: 2542-2550, 1972.*
- 32) Napoli J.L.; Race K.R.; " Microsomes convert retinol and retinal into retinoic acid, and interfere in the conversions catalyzed by cytosol" *Bichim. Biophys. Acta 1990 May 16: 1034(2)*
- 33) Nierenberg D.W.; Lester D.C. " determination of Vitamin A and E in serum aand plasma using a siomplified clarification method and high-performance liquid cromatography." *J. Chromatogr. Dec 13 1985, 345(2) p 257-84.*
- 34) " Nomenclature Policy:Generic Descriptors and trivial names for vitamins and related compounds".*J. Nutr. 109:8 - 15, 1979.*
- 35) Olson J.A. and Gunning D. "Cellular aspects of Vitamin A storage in rat liver. *Fed. Proc. 39:340, 1980.*

- 36) Rajan N.; Bander W.S.; Soprano D.R.; Suhara A.; Goodman D.S.; "Cellular retinol-binding protein messenger RNA levels in normal and retinoid deficient rats." *J. Lipid. Res.* 1990 May;31(5): 821-9.
- 37) Rask L.; Anundi H. and Peterson P.A. "Primary Structure of Human Retinol Binding Protein". *FEBS Lett.* 104: 55-58, 1979.
- 38) Rietz P.; Wiss O. and Weber F. "Metabolism of Vitamin A and determination of Vitamin A status" *Vit. Horm.* 32: 273-249, 1974.
- 39) Rodriguez M.S. and Irwin M.I. "Vitamin requirements of man" *J. Nutr.* 102: 909-968, 1972.
- 40) Smith J.E. and Goodman D.S.: "Retinol Binding Protein and the regulation of Vitamin A transport." *Fed. Proc.* 38: 2504-2509, 1979.
- 41) Sommer A.; Hussaini G.; Tarwatjo I.; Susanto D. and Soegihartol.: "Incidence, Prevalence and scale of binding malnutrition." *Lancet* 1 1407-1408., 1981.
- 42) Sporn M.B. and Newton D.L.: "chemoprevention of cancer with retinoids." *Fed. Proc.* 38: 2528-2534, 1979.
- 43) Strohecker R.; Henning H.M.: "Vitamin Assay" Ed. Verlag Chemie 1965.
- 44) "The Pathophysiological basis of Vitamin A toxicity." *Nutrition Reviews* 40: 272-274, 1982.
- 45) "The Therapeutic uses of Vitamin A". *Acta Derm. Venerol* 55 (suppl 74): 11-185, 1975.
- 46) Toro O.; de Pablo S.; Aguayo M. Gattán V.; Contreras I.; Monckeberg F. : "Prevention of Vitamin A deficiency by fortification on sugar. A field study." *Arch. Latin. Nutr.* Vol. XXVII Jun 1977 No. 2.
- 47) Tosukh Wong P. and Olson J.A.: "The Synthesis, Biological Activity and Metabolism of 15-(6,7-14 C₂)-and 15(2)-(21-3H)₂ Methyl retinone, 15- methyl retinol and 15-dimethyl retinol in rats." *biochem. Biophys. Acta* 529: 438-453, 1978.

- 48) *Vitamin A Deficiency and Xerophthalmia.* "World Health Organization, Technical Report Series No. 672, Génova, 1982.
- 49) *Wolf G.* "Historical Note on the Mode of Administration of Vitamin A for the cure of night Blindness. *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 290-292, 1978.
- 50) *Wolzak A.; Bressani R.;* "Efecto de la calidad y cantidad de proteína dietaria en la tasa de depleción de Vitamina A y disponibilidad Biológica de los precursores de Vitamina A." *Arch. Latinoamericanas Nutr.*; 36(6): 451-31, Sept 1986.
- 51) *Zille M.H. and Cullum M.E.* "The function of Vitamin A: Current Concepts." *J. Ch.* 1984, 309: 299-307.